



中华人民共和国国家标准

GB/T ××××—201×

食品接触表面清洗消毒效果试验方法 三磷酸腺苷生物发光法

Food contact surfaces cleaning and disinfection efficacy test method—
ATP bioluminescence method

20××-××-××发布

20××-××-××实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国食品用洗涤消毒产品标准化技术委员会(SAC/TC 395)归口。

本标准起草单位：上海市计量测试技术研究院、中国日用化学工业研究院、艺康(中国)投资有限公司、洛娃科技实业集团有限公司。

本标准主要起草人：刘刚、徐勤、李妍、许丽、季振栋、季靓、赵丽珺、俞云表、姚晨之、赵建利。

食品接触表面清洗消毒效果试验方法

三磷酸腺苷生物发光法

1 范围

本标准规定了一种基于三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)生物发光原理进行食品接触表面清洗消毒效果评价的试验方法。

本标准适用于采用三磷酸腺苷生物发光法对食品接触表面清洗消毒效果进行的评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

食品接触表面 food contact surfaces

食品包装材料、容器,食品加工、生产和经营中的器具、餐具、设备、地面、墙面等可能与食品直接接触的表面。

3.2

清洗 cleaning

除去物品上的污染,使之达到预定用途或进一步处理所需的过程。

3.3

消毒 disinfection

杀灭或清除传播媒介上病原微生物,使其达到无害化的处理过程。

3.4

相对发光单位 relative light unit ;RLU

化学发光分析仪的发光计量单位。

4 原理

三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)是生命过程的主要能量来源,在细菌、酵母菌和霉菌以及所有的动物和植物体中,包括食物和食物残渣中都含有 ATP,而无生命的碎屑物质中不存在 ATP。生物活性物质中的 ATP 含量是相对恒定的,借助荧光素-荧光素酶发光反应可以对 ATP 进行定量,从而可以反映出生物量残留,因此可以对清洗消毒效果进行评价。

5 ATP 检测方法

5.1 方法一：手持式 ATP 生物发光检测仪涂抹法

5.1.1 试剂和材料

仪器配套的涂抹采样棒。

5.1.2 仪器

手持式 ATP 检测仪。

5.1.3 涂抹采样方法

从试管内取出采样棒，食指与拇指握住采样棒上端，确保采样棒可以被旋转。轻轻向下施压，并不断转动采样棒。在选定涂抹区域内，水平、上下重复涂抹该区域直至涂抹完整个表面。涂抹完成后将涂抹采样棒放回试管中。对于平头取样器，与涂抹表面保持垂直，并采用同样方式覆盖整个表面。

5.1.4 ATP 的检测

按仪器说明书进行开机和校正后，将采样棒完全按入试管中，激活 ATP 发光反应。快速来回振荡采样棒约 5s，充分混合试剂，将试管插入仪器中进行检测。测得结果表示为相对光单位(RLU)。

5.1.5 注意事项

使用手持式 ATP 发光检测仪涂抹法需注意以下事项：

- a) 涂抹过程中手不要触及采样头及涂抹表面；
- b) 操作者要执行统一一致的涂抹方式以得到可重复的结果；
- c) 一旦采样完，建议立即进行检测；一旦激活后，检测应 30s 内进行；
- d) 不同制造商提供的涂抹采样棒应使用各自配套的仪器进行检测，检测结果可以参考仪器供应商提供的标准，同时得到供应商培训合格后方能从事检测工作；
- e) 不同仪器检测数值不能混在一起比较，当使用不同厂家的仪器进行该实验，所得结果可能不一致。

5.2 方法二：台式化学发光分析仪检测法

5.2.1 试剂和材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T 6682 中规定的三级或以上的的水。

5.2.1.1 ATP 检测试剂盒。试剂盒包括细胞裂解液、检测缓冲液、荧光素-荧光素酶混合物、ATP 标准溶液。

5.2.1.2 无菌水。高压灭菌后的实验用水。灭菌条件为：压力 103 kPa，温度 121 °C~126 °C 下蒸汽灭菌 20 min。本标准中的灭菌操作均使用该条件。

5.2.1.3 经高压灭菌的金属镊子。

5.2.1.4 滤纸片。将滤纸片剪成 5 cm×5 cm 规格，高压灭菌后使用。

5.2.2 仪器

普通实验室仪器和以下仪器。

5.2.2.1 微孔板化学发光分析仪。

- 5.2.2.2 高压灭菌锅。
- 5.2.2.3 离心机。
- 5.2.2.4 移液器,带已灭菌的一次性枪头。
- 5.2.2.5 经高压灭菌的玻璃器皿。
- 5.2.2.6 已灭菌塑料离心管,15 mL。

5.2.3 采样和提取

用灭菌镊子将 5 cm×5 cm 的湿润灭菌滤纸片紧贴食品接触表面,并用镊子牵引滤纸在被测样品表面轻轻来回移动 1 min,置于有 5 mL 细胞裂解液的离心管中,充分振荡后,将离心管放入离心机中,设置离心机温度为 4 ℃,离心力为 12 000 g,离心时间 5 min。离心后滤纸碎片聚集在离心管的底部,用移液器取出上层清液,用于后续测定。

5.2.4 检测

按照 ATP 检测试剂盒说明书,将荧光素-荧光素酶混合物溶解到检测缓冲液中,加入足量的细胞提取液,用微孔板化学发光分析仪检测响应(有些系统要求将荧光素-荧光素酶混合物注射到样品中),得到 RLU 值。

每份样品平行分析三次。

5.2.5 注意事项

使用台式发光分析仪检测法需注意以下事项:

- a) 检测 ATP 时应使用洁净无 ATP 的玻璃器皿;
- b) 荧光素酶的冻融次数不宜超过 3 次,反复冻融会导致其逐渐失活;
- c) 裂解后样品中的 ATP 在室温不太稳定,需在 4 ℃或冰上操作。ATP 在冰上可以稳定长达 6 h;
- d) 细菌能在无菌水中生存和繁殖,这会造成 ATP 的干扰,因此无菌水的质量应定期检验。

6 实验室清洗消毒效果评价方法

6.1 仪器

- 6.1.1 高压灭菌锅。
- 6.1.2 恒温培养箱。
- 6.1.3 离心机。
- 6.1.4 生物安全柜。

6.2 试剂和材料

- 6.2.1 大肠杆菌菌株。
- 6.2.2 LB 液体培养基。配制方法:950 mL 实验用水中加入胰蛋白胍 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g,摇动容器直至溶质溶解。用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0,用实验用水定容至 1 L 在 103 kPa 高压下蒸汽灭菌 20 min。
- 6.2.3 一次性塑料无菌培养皿,直径为 9 cm。
- 6.2.4 灭菌美工刀。
- 6.2.5 灭菌棉棒。
- 6.2.6 灭菌离心管。

6.3 人工污染

6.3.1 细菌培养

大肠杆菌菌株活化后,取 1 mL 大肠杆菌培养液接种至 100 mL 灭菌的 LB 液体培养基中,37 °C 培养箱 220 r/min 速率震荡培养 24 h。

6.3.2 被污染载体制作

用灭过菌的美工刀在一次性塑料无菌培养皿底部划出痕迹,从左至右、从上至下、从左上至右下、从右上至左下各 40 下,见图 1。

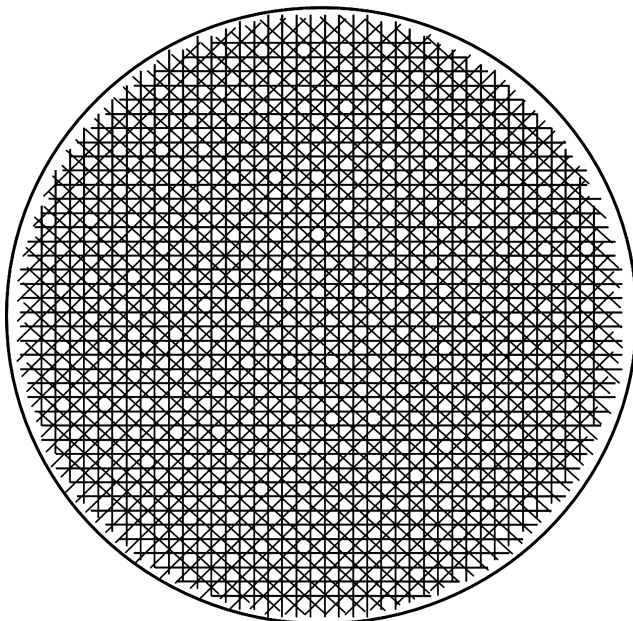


图 1 用培养皿制作的载体

6.3.3 人工污染样品制备

将培养好的大肠杆菌溶液倒入灭菌离心管中,用离心机 2 000 g 离心 2 min,弃去液体部分,只保留底部细菌。在生物安全柜中,使用灭菌棉棒沾取细菌并来回均匀涂抹于培养皿制作的载体,使载体表面均匀地沾满细菌。待表面干燥后,使用灭菌水冲洗表面 1 min,待表面自然干燥后检测。同时制作六个人工污染样品,其中三个进行清洗消毒。实验后,污染表面应灭菌处理,防止造成潜在的生物危害。

6.4 样品的清洗消毒

采用符合国家有关卫生法规的洗消剂、消毒设备对表面进行清洗消毒,根据不同的清洗消毒方法,应该按照其规定的操作程序。具体可参考 GB 14934。

6.5 结果计算

人工污染样品,在清洗消毒之前,用方法一或方法二检测 ATP 含量(RLU),重复检测三次取平均值,记为 n_1 ;在清洗消毒之后,用同样的方法检测 ATP 含量(RLU),重复检测三次取平均值,记为 n_2 ;作为阴性对照,用无菌 LB 液体培养基涂抹在载体上,使用同样方法检测 ATP 含量,重复检测三次取平均值,记为 n_0 。

清洗消毒对食品接触表面生物量的去除率以百分数表示,并作为食品接触表面清洗消毒效果的评价结果,按式(1)计算:

$$f = \frac{n_1 - n_2}{n_1 - n_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

f ——生物去除率;

n_1 ——清洗消毒前 ATP 测量平均值,RLU;

n_2 ——清洗消毒后 ATP 测量平均值,RLU;

n_0 ——阴性对照的 ATP 测量平均值,RLU。

